

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

SARA ZEMLJIĆ

**TRAJANJE STANIČNE IMUNOSTI U KOKOŠI LAKE PASMINE ZA VIRUS
NEWCASTLESKE BOLESTI ODREĐENE STIMULACIJOM LEUKOCITA *IN VITRO***

Diplomski rad

ZAGREB, 2018.

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik zavoda: doc.dr.sc. Željko Gottstein

Mentori: doc.dr.sc. Željko Gottstein

dr.sc. Gordana Nedeljković

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. dr.sc. Selma Pintarić
2. dr.sc. Gordana Nedeljković
3. doc.dr.sc. Željko Gottstein

Zahvala

Zahvaljujem svom mentoru doc.dr.sc. Željku Gottstein, na pomoći i podršci prilikom odabira teme i izrade diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Gordani Nedeljković, na velikoj pomoći i brojnim savjetima koje mi je pružila tijekom izrade ovog rada. Hvala Vam što ste uvijek imalistrpljenja i vremena za moje upite.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama i prijateljima koje sam stekla za vrijeme svog studija. Hvala na svakom studentskom danu koji nikad neću zaboraviti.

Hvala Robertu koji mi je bio veliki oslonac onda kada je to bilo najpotrebnije. Hvala što si uvijek tu.

Na kraju, najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili studiju gurali me dalje onda kada je to bilo potrebno. Bez Vas ne bi bilo ove diplome, stoga je ona jednim dijelom i Vaša. Hvala i Vama što ste uvijek tu.

POPIS PRILOGA

Slike

Slika 1. Virus Newcastleske bolesti

Slika 2. Usporedba humoralne i stanične imunosti

Slika 3. Razlika hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije

Slika 4. Mehanizmi citotoksičnosti

Slika 5. Protočni citometar

Slika 6. Imunoenzimni test

Slika 7. ELISPOT

Slika 8. Prikaz metode lančane reakcije polimerazom (PCR)

Slika 9. Prikaz faza lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Slika 10. Specifični titar protutijela virusa newcastleske bolesti u dvije skupine kokoši
sa različitim haplotipom, izmjeren ELISA-om

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1. . Newcastleška bolest i virus newcastleske bolesti	2
2.1.1.Imunoprofilaksa NB	3
2.2. IMUNOSNI ODGOVOR.....	4
2.2.1. Imunosni odgovor na VNB	6
2.3. ODREĐIVANJE IMUNOSTI (MJERENJE STUPNJA ZAŠTITE POSTIGNUTE CIJEPLJENJEM)	6
Određivanje humoralne imunosti za NB	7
3. RASPRAVA.....	18
4. ZAKLJUČCI.....	21
5. LITERATURA.....	22
6. SAŽETAK.....	26
7. SUMMARY.....	27
8. ŽIVOTOPIS.....	28

1. UVOD

Newcastleska bolest je kontagiozna virusna zarazna bolest kokoši i drugih vrsta ptica, koju uzrokuje ptičji RNK *Avulavirus* 1, poznat i kao virus newcastleske bolesti (VNB), roda *Avulavirus*, porodice *Paramyxoviridae* (SUSTA i sur., 2010.; AMARASINGHE et al., 2017.). Bolest je zabilježena diljem svijeta, a od posebnog značaja je zbog velikih gospodarskih šteta koje nanosi u intenzivnim i ekstenzivnim uzgojima peradi, primarno kokoši i purana.

U Republici Hrvatskoj bolest se ne liječi i, kao i u većini zemalja Europe, suzbija se po zakonu. Kontrola u slučaju pojave bolesti i imunoprofilaktičke mjere provode se sukladno Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti koja se donosi svake godine za teritorij Republike Hrvatske (ANONYM., 2017.) te Pravilniku o mjerama kontrole Newcastleske bolesti (ANONYM., 2013.). Za provođenje imunoprofilaktičkih mjera koriste se živa atenuirana cjepiva ili inaktivirana cjepiva za perad u proizvodnji. Za sprječavanje unosa VNB na farme i širenje među uzgojima koriste se još i nespecifične mjere koje uključuju provođenje biosigurnosnih mjera na farmi, mjere dobre proizvodne prakse (all in-all out), edukaciju osoblja te neškodljivo uklanjanje („stamping out“) svih zaraženih životinja i lešina u slučaju potvrde bolesti. Neke zemlje kao što su Finska, Švedska i Danska, ne primjenjuju imunoprofilaktičke mjere, već isključivo „stamping out“ metodu u slučaju pojave bolesti (MILLER i KOCH, 2013.).

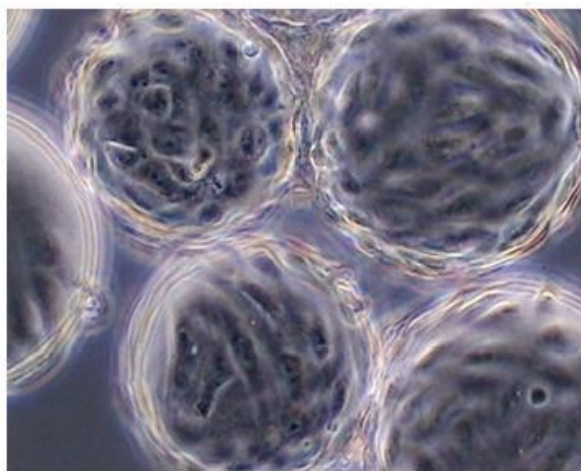
Razina zaštite postignuta cijepljenjem najčešće se, zbog jednostavnosti izvođenja, procjenjuje utvrđivanjem razine humoralne imunosti tj. titra specifičnih protutijela. Međutim, razina stanične imunostiza različite virusne bolesti jednako ukazuje na adekvatnu zaštitu organizma od moguće zaraze, a podaci o njenom trajanju nisu poznati. Budući da je određivanje razine stanične imunosti složeno i vremenski zahtjevno, u praksi se rijetko izvodi.

Svrha ovog diplomskog rada je opisati načine dokazivanja i utvrđivanja razine i trajanja stanične imunosti za VNB u komercijalnih kokoši nesilica lake pasmine različite dobi pod standardnim programom imunoprofilakse.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Newcastleska bolest i virus newcastleske bolesti

Virus newcastleske bolesti (VNB) je vrlo kontagiozan (Slika 1.), može inficirati skoro sve vrste ptica (KALETA i BALDAUF, 1988.), od kojih su kokoši i purani najprijemljiviji, te može dovesti do pomora i do 100% zahvaćenih životinja (ALEXANDER i SENNE, 2008.). S obzirom da se virus širi domaćom perad, ali isto tako i divljim pticama, vrlo je važno razviti efikasnu zaštitu za jata peradi u uzgoju (NORUP i sur., 2011.).



Slika 1. Virus Newcastleske bolesti

(Izvor: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/586363/fig3/>)

Primarni izvori bolesti su najčešće klinički ili latentno inficirane ptice, dok od sekundarnih izvora zaraze treba spomenuti zagađenu hranu i vodu, zrak, lešine, perje, meso, kaveze, prostorije, stelju, prijevozna sredstva i osoblje koje je bio u kontaktu s oboljelim pticama. Bolest se širi horizontalno, izravnim ili neizravnim dodir, dok vertikalni prijenos nije zabilježen, s obzirom da zaraženi zametci ugibaju. Glavna ulazna vrata VNB su sluznice dišnog i probavnog sustava. VNB se izlučuje izmetom, sekretom iz nosa, ždrijela i očiju te slinom. (ALEXANDER i SENNE, 2008.).

Prema kliničkoj slici koju izazivaju u kokoši, viruse NB smo svrstali u pet patotipova: velogeni viscerotropni, velogeni neurotropni, mezogeni, lentogeni i asimptomatski crijevni. Klinički znakovi zabilježeni u zaraženih ptica različiti su ovisno o virulenciji i tropizmu

uzročnog virusa, ali i dobi, vrsti, zdravstvenom (druge infekcije) i imunosnom statusu domaćina (MILLER i KOCH, 2013.).

Newcastleska bolest može biti uzrokovana infekcijom samo virulentnih (velogenih i mezogenih) sojeva VNB-a (vVNB; ANONYM., 2012.), pri čemu može dovesti do naglog pomora peradi. Za razliku od toga, virusi slabe virulencije ne uzrokuju NB, već, u prisutnosti druge infekcije ili nepovoljnih uvjeta okoliša, samo pogoduju bolestima dišnog sustava (MILLER i KOCH, 2013., AMARASINGHE i sur., 2017.).

Patoanatomski nalaz je različit te ovisi o virulenciji i tropizmu virusa. Dijagnoza bolesti se može postaviti na temelju rezultata seroloških proba, prije svega probe inhibicije hemaglutinacije (IHA), imunoenzimnog testa (ELISA) i serum-virus neutralizacijskog testa. No, izravan dokaz virusa je najsigurnija potvrda NB (BIĐIN, 2008.), pri čemu je njegova molekularna karakterizacija, posebice slijeda baza i izvedenog slijeda aminokiselina na mjestu cijepanja fuzijskog (F) proteina, i zakonska obaveza prilikom prijave svake sumnje na ovu bolest (ANONYM., 2012; ANONYM., 2016.).

2.1.1. Imunoprofilaksa NB

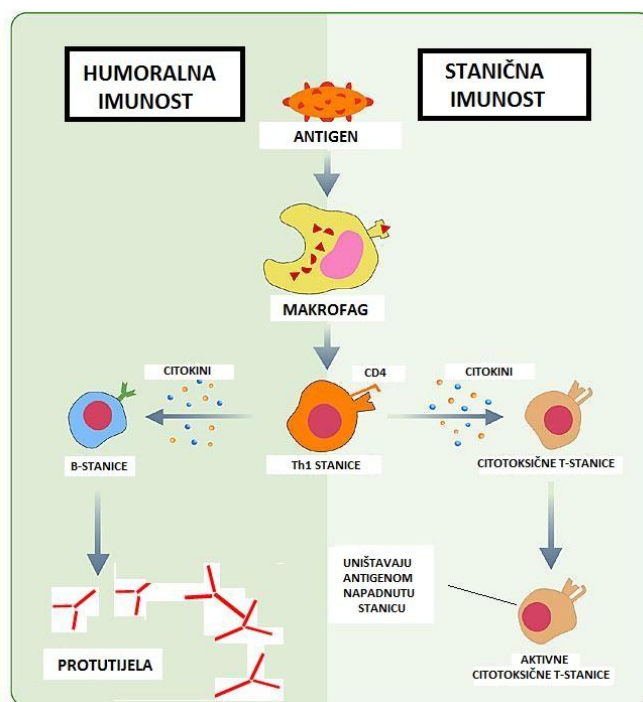
Imunoprofilaksom se na umjetan način unosom oslabljenog ili prirodno slabo virulentnog patogena potiče prirodna obrana organizma. Za provođenje imunoprofilaktičkih mjera za NB koriste se živa, atenuirana i inaktivirana cjepiva proizvedena od prirodno lentogenih sojeva, poput La Sota ili B1, koja se primjenjuju okulonazalno, raspršivanjem ili pitkom vodom, te parenteralno (GALLILI i BEN-NATHAN, 1998.).

Imunoprofilaktičkim mjerama se nastoji postići zaštita organizma peradi za čitavo vrijeme proizvodnje. Perad se u intenzivnoj proizvodnji cijepi živim cjepivom raspršivanjem već 1. dan u valionici ili 10-12 dana nakon valjenja, ovisno o razini materijalnih protutijela. Ovakvo jednokratno cijepljenje dovoljno je za linije peradi u toku koji traje ispod 40 dana. Ukoliko je epizotički opravdano, dodatno cijepljenje brojlera živim cjepivom može se provesti u dobi od 17.-21. dana. U slučaju duže proizvodnje, naročito u jata lakih i rasplodnih nesilica provodi se višekratno cijepljenje živim sojevima kako bi se potaknuo što širi imunosni odgovor, naročito na sluznicama. Neposredno prije početka proizvodnje, u dobi od oko 5 do 6 tjedana i 14 do 16 tjedana nesilice se cijepi živim cjepivima, te u dobi od 20 tjedana, inaktiviranim cjepivima kako bi se potaknuo visoki titar specifičnih protutijela i životinje zaštitilo tijekom čitavog proizvodnog ciklusa (GALLILI i BEN-NATHAN, 1998.; GOTTSTEIN i sur., 2017.).

Pored imunoprofilaktičkih mjera u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji, u Hrvatskoj sva perad u ekstenzivnim uzgojima, nojevi i golubovi iz uzgoja te pernata divljač također mora biti cijepljena protiv NB dva puta godišnje u razmaku od najmanje 4 mjeseca (ANONYM., 2017.). Cilj cjepnog programa je da perad u proizvodnji bude uvijek imuna, no u slučaju pojave bolesti primjenjuje se „stampingout“ metoda (sve sumnjive i bolesne životinje se žrtvuju i neškodljivo uklanjaju) (BIĐIN, 2008.).

IMUNOSNI ODGOVOR

Glavna funkcija imunskog odgovora je prepoznati i odstraniti strane mikroorganizme (KAPCZYNSKI, 2008.). Imunosni odgovor čine nespecifični mehanizmi urođene obrane i za antigen specifični mehanizmi stečene obrane (Slika 2.).



Slika 2. Usporedba humoralne i stanične imunosti (Preuzeto i prilagođeno sa: <http://staffweb.itsligo.ie/staff/dgreaney/x3p5k2/Leachtanna/Diagrams/Immune%20response.jpg>)

Urođeni imunosni odgovor sadrži čimbenike koji postoje već prije pojave infekcije i sposobni su vrlo brzo reagirati na mikroorganizme i uništiti ih. Sastavnice urođene imunosti peradi su (1) fizičke i kemijske barijere, kao što su perje i koža, sluznice i sluz koja se proizvodi na samim sluznicama; (2) fagocitne stanice, što uključuje heterofile, makrofage i prirodno ubilačke (engl. natural killer, NK) stanice; (3) proteini sustava komplementa i medijatori upale; (4) citokini i kemokini. Urođeni imunosni odgovor je neposredna reakcija na

virusnu infekciju koja služi za kontrolu i sprječavanje umnažanja i širenja virusa te potiče početak i razvoj specifičnog imunosnog odgovora (KAPCZYNSKI i sur., 2013.).

Kao dio *stečene imunosti*, važnu ulogu u obrani imaju stanična i humoralna imunost (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Humoralna imunost je imunost posredovana protutijelima koja nastaju nakon ulaska određenog antigena u organizam i specifična su za njega. Nosioци humoralne imunosti su B-limfociti koji se u dodiru s antigenom diferenciraju u plazma stanice koje proizvode različite razrede protutijela. Dio B-limfocita se ne diferencira, već zaostaje u krvotoku u funkciji prisjetnih stanica (DAY i SCHULTZ, 2013.). Prisjetne stanice pokreću jači, tzv. „booster“ imunosni odgovor pri ponovnom susretu s antigenom.

Stanična imunost je imunost posredovana T-limfocitima, a djelomično je odgovorna za uklanjanje antigena. Stanični imunosni odgovor igra važnu ulogu u infekciji divljim VNB isto kao i u umjetno stečenoj imunosti potaknutoj cijepljenjem. No, bez obzira na to, provjera razine stanične imunosti nije bila uobičajena u peradi (DALGAARD i sur., 2010.).

T-limfociti, odnosno subpopulacije $CD4^{+}$ pomoćnički T-limfociti (Th-limfociti) i $CD8^{+}$ citotoksični T-limfociti (Tc-limfociti), uključujući citokine koje oni izlučuju, čine glavne stanice staničnog imunosnog odgovora protiv virusnih bolesti. Stanična imunost je vrlo bitna u virusnoj infekciji s obzirom da virusna patogeneza uključuje i intracelularnu fazu pa procjenu humoralne stanične imunosti za virusnu infekciju treba provjeravati zajedno (KHALIFEH i sur., 2009.). Stanična imunost se može mjeriti proliferacijom limfocita ili proizvodnjom citokina nakon *in vitro* stimulacije antigenom (LAMBRECHT i sur., 2004.).

Citokini su topljivi polipeptidi i glikopeptidi male molekularne mase, vrlo snažnog učinka. Zajedno s kemokinima, citokini su posrednici (medijatori) koji potiču nastanak upale (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.; DAY i SCHULTZ, 2013.). Proizvode ih različiti tipovi stanica hematopoetskog i nehematopoetskog podrijetla, a imaju supresivan ili poticajnu učinak na staničnu proliferaciju, diferencijaciju i pokretljivost (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.). Ključni su posrednik u komunikaciji stanica imunosnog sustava: makrofaga i NK-stanica, antigen predočujućih stanica (*engl.* antigen presenting cells, APC), T- i B-limfocita, (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Interferon γ , još se naziva „imunosni interferon“, je interferon tipa II kojeg primarno proizvode pomoćničke T-stanice tipa 1 (Th1) i NK-stanice kao odgovor na antigensku ili

mitogenu stimulaciju. Igra vrlo važnu ulogu u aktivaciji i regulaciji staničnog odgovora (DAI i sur., 2016.).

2.2.1. Imunosni odgovor na VNB

Glavno mjesto prodora VNB su sluznice dišnog i probavnog sustava gdje se aktivira početni imunosni odgovor te dolazi do infiltracije epitela limfocitima, makrofagima i heterofilima (AL-GARIB i sur., 2003.). Samo urođeni imunosni odgovor nije dovoljan da zaštiti cijeli organizam od infekcije (MILLER i KOCH, 2013.). Nakon početnog urođenog imunosnog odgovora pokreću se stanični i humoralni odgovor. Šest sati nakon infekcije stanice slezene počinju proizvoditi interferone alfa i beta ($\text{IFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\beta$), interleukine 6 (IL-6) i 1β ($\text{IL-1}\beta$) (KAPCZYNSKI i sur., 2013.).

Do razvoja stanične imunosti dolazi jedan dan nakon infekcije kada se iz NK-stanica luči interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) koji aktivira makrofage (MILLER i KOCH, 2013.).

Lokalna imunost, nakon cijepljenja VNB, se procjenjuje proizvodnjom protutijela, prvenstveno IgA razreda. Kada perad cijepimo živim cjepivom raspršivanjem, okulonazalno ili pitkom vodom, VNB dospijeva do limfoidnog tkiva bronha, dušnika ili probavnog trakta gdje nakupine limfocita započinju lokalnu imunosnu reakciju koja se može procijeniti temeljem proizvodnje imunoglobulina. Nakon okulonazalne primjene lentogenih ili mezogenih sojeva VNB, povećava se broj T- i B-limfocita u Harderovoj žlijezdi, te dolazi do aktivacije i proliferacije Th- i Tc-limfocita. Nakon aktivacije T-limfocita, izlučuju se citokini čija je uloga inhibicija replikacije virusa (AL-GARIB i sur., 2003.).

Dokaz specifičnih protutijela u serumu je potvrda infekcije organizma VNB-om ili odgovora na cijepljenje. Prva protutijela, koja se u serumu mogu dokazati već 4 dana nakon cijepljenja, su IgM razreda. Nakon 7 dana u serumu se mogu dokazati IgY i IgA protutijela koja su važna za lokalnu imunost sluznica (AL-GARIB i sur., 2003.).

ODREĐIVANJE IMUNOSTI (MJERENJE STUPNJA ZAŠTITE POSTIGNUTE CIJEPLJENJEM)

Zaštita organizma od različitih virusnih bolesti peradi se postiže cijepljenjem, što je u intenzivnoj proizvodnji i ekstenzivnom načinu držanja peradi, od izuzetne važnosti za proizvodne rezultate te za smanjenje gubitaka tijekom same proizvodnje.

S obzirom da perad reagira na cjepivoputem humoralnog i staničnog imunskog odgovora, uspješnost cijepljenja u proizvodnim jatima najčešće se provjerava dokazivanjem porasta titra specifičnih protutijela nekoliko tjedana nakon cijepljenja, odnosno praćenjem humoralnog imunskog odgovora (BALENOVIĆ, 2009.).

No, istraživanja su pokazala da određivanje dinamike ekspresije gena i lučenja citokina, poglavito IFN- γ , nakon *in vitro* stimulacije, može biti vrlo dobar pokazatelj stanične imunosti u kokoši nakon cijepljenja ili infekcije (LAMBRECHT i sur., 2004.; KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.).

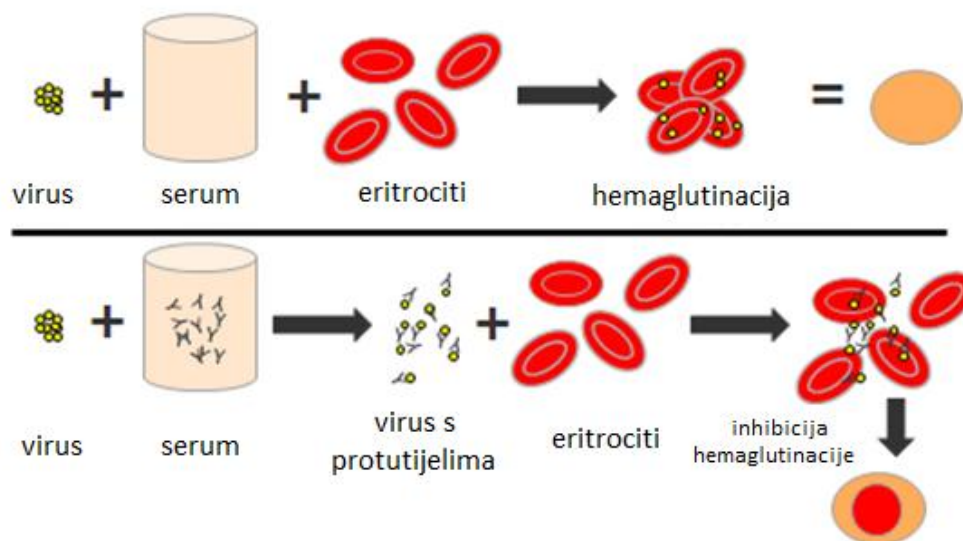
Određivanje humoralne imunosti za NB

Za procjenu humoralne imunosti, odnosno određivanje titra serumskih protutijela, najčešće se koriste probe inhibicija hemaglutinacije (IHA) i imunoenzimni test (ELISA). Najčešće se koriste kako bi se izmjerila djelotvornost postojećeg cjepnog programa na proizvodnoj farmi. Međutim, serološke metode nisu dovoljno pouzdane za postavljanje dijagnoze NB s obzirom da se ne može odrediti razlika između odgovora organizma na infekciju divljim VNB od odgovora na cijepljenje (KAPCZYNSKI i sur., 2013.; MILLER i KOCH, 2013.).

Inhibicija hemaglutinacije (IHA)

Hemaglutinacijskim testom određuje se hemaglutinacijski titar virusa, tj. najveće razrjeđenje virusa u kojem je vidljiva aglutinacija eritrocita (Slika 3). Svrha testa je odrediti hemaglutinacijsku jedinicu (HAJ) virusa za primjenu u probi inhibicije hemaglutinacije.

Temelj IHA probe je da aglutinaciju eritrocita posredovanu virusom specifično inhibiraju protutijela iz seruma (Slika 3.). IHA titar protutijela je najveće razrjeđenje seruma koji uzrokuje inhibiciju 4 HAJ virusa. Pozitivnima se smatraju sve životinje čiji je titar seruma veći od 2^4 , tj. 1:16 (ANONYM., 2016.). U zemljama koje ne provode imunoprofilaktičke mjere serologija se koristi za potvrdu izloženosti divljem VNB. Povišenje titra siguran je dokaz da je ptica bila izložena virusu te je za postavljanje konačne dijagnoze potrebno još provesti izdvajanje i molekularnu tipizaciju VNB (KHALIFEH i sur., 2009.).



Slika 3. Razlika hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije (Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.swine-influenza.com/home/diagnostic/methods-of-diagnostics/antibodies/>)

Ukoliko se koriste serumi drugih vrsta životinja, može doći do lažno pozitivnih rezultata u testu inhibicije hemaglutinacije pa se tako preporuča korištenje propisanog protokola svjetske organizacije za zdravlje životinja (ANONYM, 2012.).

Imunoenzimni test (ELISA)

Imunoenzimni test (ELISA) je najčešće korištena serološka proba u dijagnostici zaraznih bolesti životinja, a prvenstveno se koristi za dokaz specifičnih protutijela u serumu (DAY i SCHULTZ, 2013.).

S obzirom da IHA proba otkriva samo protutijela specifična za hemaglutinin neuraminidiazu (HN) VNB, a ELISA otkriva protutijela za sve proteine VNB-a, postoji povezanost ovih dvaju testova. Da bi se procijenila ujednačenost cijepljenja za neko jato peradi, dostupni su također i komercijalni ELISA kitovi (MILLER i KOCH, 2013.).

ELISA testovi su specifični za vrstu domaćina jer ovise o upotrebi primarnog monoklonskog protutijela specifičnog za antigene epitope uzročnika (VNB) i sekundarnog monoklonskog protutijela vrsto specifičnog za imunoglobuline domaćina (pileće IgY, IgM ili IgA) (MILLER i KOCH, 2013.).

Određivanje stanične imunosti za VNB

Za razliku od određivanja humoralne imunosti putem IHA-e ili ELISA-e, procjena stanične imunosti zahtijeva puno više postupaka u samom izvođenju te stoga predstavlja veći izazov pri izvođenju.

Prema dosadašnjim istraživanjima, staničnu imunost možemo odrediti mjereći proliferaciju imunskih stanica nakon stimulacije *in vitro*. Stanice koje se pritom najčešće koriste su splenociti, koji se izdvajaju iz slezene lešine, i leukociti, prvenstveno limfociti, koji se izdvajaju iz pune krvi. Izdvojene stanice se nakon toga stimuliraju. Stimulacija može biti specifična, s inaktiviranim antigenom, ili nespecifična, s mitogenom. Od mitogena se koriste lipopolisaharidi (LPS), konkavalin A (conA), forbol miristat acetat (PMA) u kombinaciji s ionomicinom, fitohemaglutinin (PHA) i drugi (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Za mjerenje eproliferacije stimuliranih stanica koriste se različite metode. Proliferacija se može izmjeriti:

A) izravno, protočnom citometrijom (FCM, *engl.* flow cytometry), odnosno analizom stanica prema fenotipu i unutarstaničnim bojenjem, i

B) posredno, imunoenzimnim testom (ELISA) ili molekularnim metodama (lančanom reakcijom polimerazom (PCR)), na temelju dokaza izlučenih citokina (interferoni i interleukini) ili ekspresije gena koji za njih kodiraju.

Posljednjih nekoliko godina mjerenje staničnog odgovora u kokoši postalo je izuzetno važno, ne samo za procjenu kvalitete već i opsega imunskog odgovora. Testovi za procjenu staničnog imunskog odgovora uključuju indukciju IFN- γ odgovora u stimuliranih limfocita, stanični odgovor na primjenu antigena ili mitogena u odnosu na stanje prije proliferacije limfocita, određivanje subpopulacija leukocita i specifičnih T-limfocita FCM metodom (imunofenotipizacija), te mjerenje razine citotoksičnosti promatrano kroz VNB specifične T-stanice i ciljane stanice inficirane s VNB (KAPCZYNSKI i sur., 2013.).

Stanična reakcija, koja slijedi infekciju virusom, može se dokazati najranije 2 do 3 dana nakon infekcije (KAPCZYNSKI i sur., 2013.). Isto tako, potvrđeno je da se stanični imunski odgovor na VNB može zabilježiti odmah nakon cijepljenja sa živim cjepivom. Neke studije su ispitivale aktivaciju i samu ulogu staničnog imunološkog odgovora prema VNB u ptica (KHALIFEH i sur., 2009.; RAUW i sur., 2009.; SHILPA i sur., 2014..). Mogućnost mjerenja ptičjeg staničnog imunskog odgovora se povećala tijekom posljednjih nekoliko godina. (KHALIFEH i sur., 2009.). Bez obzira na to, dostupno je vrlo malo istraživanja koja

mjere stanični odgovor, stoga su dodatno razvijeni ELISPOT (*engl.* enzyme-linked immunospot) i untarstanično bojenje proizvedenih citokina (ICS, *engl.* intracellular cytokine staining) (ARIAANS i sur., 2008.).

Mjerenje proliferacije stanica in vitro

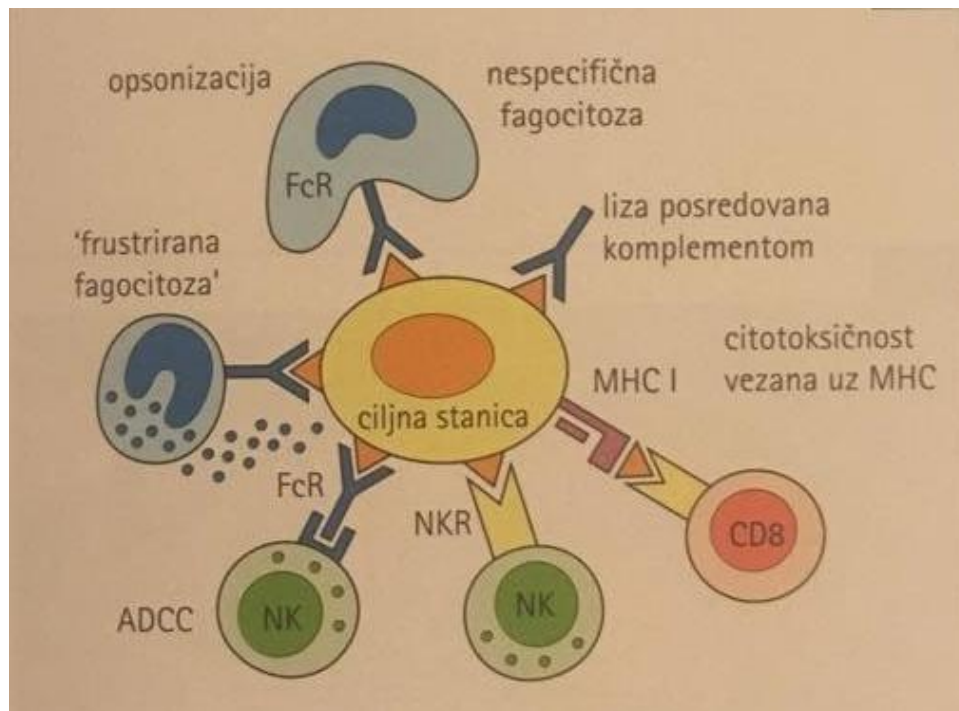
Proliferacija limfocita je prvi korak u imunosnom odgovoru na infekciju virusom (FAIRBROTHER i sur., 2004.).

Proliferacija imunskih stanica *in vitro* javlja se kao odgovor leukocita izdvojenih iz pune krvi ili splenocita izdvojenih iz slezene na stimulaciju antigenom ili mitogenima i smatra se da je usko povezana s memorijskim odgovorom Th-limfocita kojita također reguliraju i funkciju humoralnog odgovora (FAIRBROTHER i sur., 2004.; KAPCZYNSKI, 2008.). Imunosni sustav može odgovoriti proliferacijom samo ako je organizam već prethodno bio izložen virusu (KAPCZYNSKI, 2008.).

Leukocite izdvajamo iz pune krvi centrifugiranjem u gradijentu gustoće te inkubiramo *in vitro* nakon stimulacije mitogenom ili antigenom. Stimulirane stanice se počinju dijeliti, a nakon toga, moguće je mjeriti proliferaciju stanica ugradnjom ^3H -timidina u DNK (DAY i SCHULTZ, 2013.). Ovakav postupak se zbog radioaktivnosti polako izbacuje iz upotrebe te se koristi ugradnja bromodeoksiuridina (BrdU) ili fluorescentnih boja u DNK i prati fluorescencija stimuliranih i nestimuliranih stanica (KAPCZYNSKI, 2008.).

Th-limfociti, zajedno s makrofagima, komuniciraju putem izlučivanja citokina tes IL-2 i IFN- γ potiču aktivaciju, diferencijaciju i proliferaciju Tc-limfocita, koji potom specifično prepoznaju i uništavaju stanice inficirane virusom. Citotoksični T-limfociti (Tc), zajedno sa NK stanicama, čine glavnu liniju obrane od virusnih infekcija (KAPCZYNSKI, 2008.; DAY i SCHULTZ, 2013.).

Citotoksičnost je uništavanje ciljne stanice koje se može očitovati na više načina, a postiže se prepoznavanjem, adhezijom, citolizom i odvajanjem ciljne stanice (Slika 4.) (DAY i SCHULTZ, 2013.). Testovi citotoksičnosti određuju sposobnost različitih leukocita da napadnu i razgrade ciljne stanice. U klasičnoj analizi citotoksičnosti, testirane životinje se imuniziraju *in vivo* kako bi kasnije stimulirale proizvodnju Tc-limfocita. Zatim se periferne krvne stanice ili splenociti izdvajaju i uzgajaju *in vitro*. Liza ciljnih stanica se detektira putem oslobađanja aktivnosti radioaktivnog kroma (Cr) ili laktat dehidrogenaze (LDH) (FAIRBROTHER i sur., 2004.).



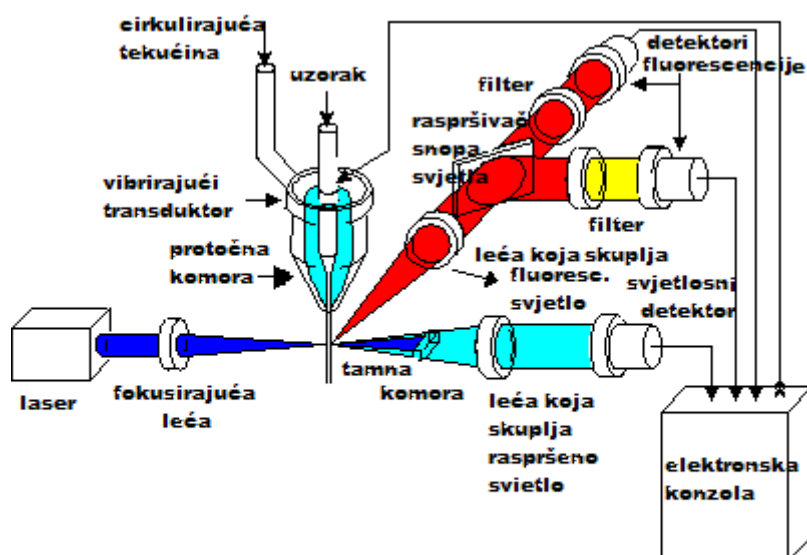
Slika 4. Mehanizmi citotoksičnosti (DAY i SCHULTZ, 2013.)

A) IZRAVNO

Izravno dokazivanje i utvrđivanja razine i trajanja stanične imunosti određuje se FCM-om, odnosno analizom stanica i unutarstaničnog bojenja.

PROTOČNA CITOMETRIJA (FCM)

Protočna citometrija je tehnika koja koristi struju tekućine za prolaz pojedinačnih stanica u nizu, kroz brojač. Koristi se za mjerenje relativne fluorescencije, veličine i granuliranosti pojedinih stanica ili čestica u složenoj suspenziji. Stanice se prethodno obilježe monoklonskim protutijelomspecifičnim za traženi stanični biljeg (antigen) na površini ili unutar stanice. Stanice obasjava laserska zraka, a fluoresciraju samo one na koje je vezan fluorokrom. Može se koristiti za mjerenje površinske ekspresije bilo kojeg staničnog biljega za koje je dostupno specifično monoklonsko protutijelo (Slika 5.) (DELUDE, 2005.; DAY i SCHULTZ, 2013.).



Slika 5. Protočni citometar (Preuzeto i prilagođeno sa: <http://olomouc.ueb.cas.cz/book/export/html/18>)

Stanice se, prije analize u protočnom citometru, moraju stimulirati antigenom ili mitogenom, nakon čega proliferiraju tijekom inkubacije, a potom ih obilježavamo protutijelima i imunofenotipiziramo kako bi kasnije, s FCM, mogli analizirati površinske markere CD4 i CD8 α (DALGAARD i sur., 2010.).

Označavanje stanica, za mjerenje proliferacije *in vitro*, najčešće se provodi unutarstaničnim bojanjem (ICS) s CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester), a tek nakon toga stanice stimuliramo antigenom ili mitogenom i inkubiramo. Metodom protočne citometrije moguće je odrediti subpopulacije limfocita koji su, nakon stimulacije, proliferirali *in vitro*. Uzorci stanica se obilježe monoklonskim protutijelima koja suobilježena fluorescentnom bojom (fluorokrom) i specifična za stanične biljege leukocita (CD45), populacije T-limfocita (CD3) i posebno za Th- (CD4+) i Tc- (CD8 α) limfocita. Pri tom se protutijela u master mješavinu dodaju prema panelima fluorokroma koje nose (npr. leukocitni i T- limfocitni panel), a koji ovise o tehničkim specifikacijama uređaja tj. dostupnim laserima i filterima (DALGAARD i sur., 2010.).

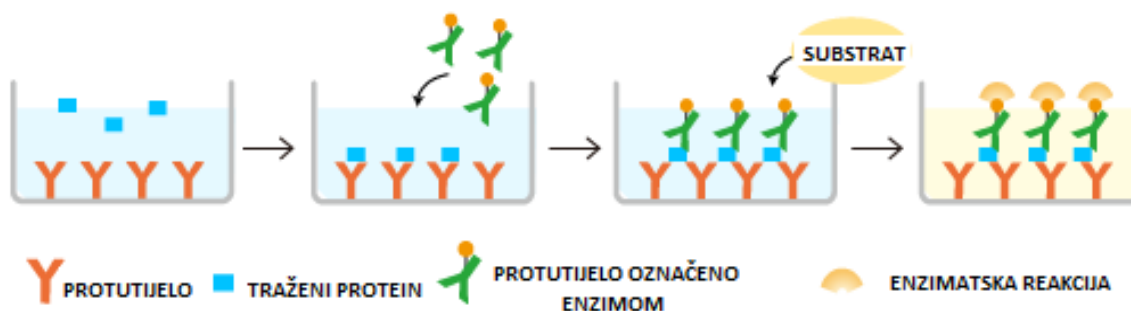
B) POSREDNO

Posredno razina i trajanje stanične imunosti određuje se dokazom izlučenih citokina (IFN- α , IFN- γ ili IL)u otopinama ELISA-om ili ELISPOT testom, te ekspresijom gena u stanicama, qPCR metodom.

Dokaz citokina u otopini:

Imunoenzimni test (ELISA)

Imunoenzimni test (ELISA) je najčešće korištena metoda u dijagnostici zaraznih bolesti životinja. Prvenstveno se koristi za dokaz specifičnih protutijela u serumu, no osim protutijela, ELISA-om je moguće dokazati antigen i druge tvariproteinske prirode (poput citokina i kemokina), te odrediti njihovu količinu u serumu i različitim tjelesnim tekućinama. Takav postupak poznatiji je pod imenom *capture* ELISA(Slika 6.) (LAMBRECHT i sur., 2004.; DAY i SCHULTZ, 2013.).



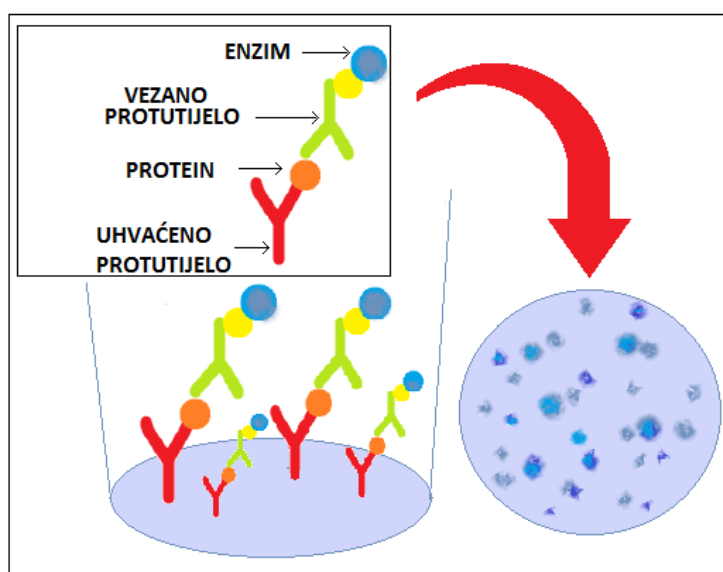
Slika 6. Imunoenzimni test

(Preuzeto i prilagođeno s: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/images/elisa-sw.png>)

ELISA je također vrlo često korištena i u ostalih vrsta životinja, te je dokazano da je vrlo pouzdana i jednostavna za mjerenje otpuštanja citokina nakon aktivacije imunskog odgovora. Stoga se smatra da je vrlo dobar pokazatelj stanične imunosti. Test je moguće primjeniti i u slučaju specifične i nespecifične stimulacije jer je specifičan za otpušteni antigen (citokin, IFN), a ne za stimulirajući agens (mitogen ili inaktivirani cjepni virus(LAMBRECHT i sur., 2004.).

ELISPOT

ELISPOT je vrlo osjetljiv imunološki test za prepoznavanje i brojenje individualnih stanica koje *in vitro* izlučuju određene proteine, protutijela i enzime, a temelji se na sandwich ELISA tehnici (Slika 7.). Također, može mjeriti frekvenciju izlučivanja citokina na staničnoj razini. Nedostatak metode je da ne daje kvalitativne informacije o vrsti stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, odnosno nema sposobnost prepoznavanja individualnih T-limfocita koje luče citokine (ARIAANS i sur., 2008.; ANONYM., 2014.).



Slika 7. ELISPOT (Preuzeto i prilagođeno sa: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/ELISPOT-en.png>)

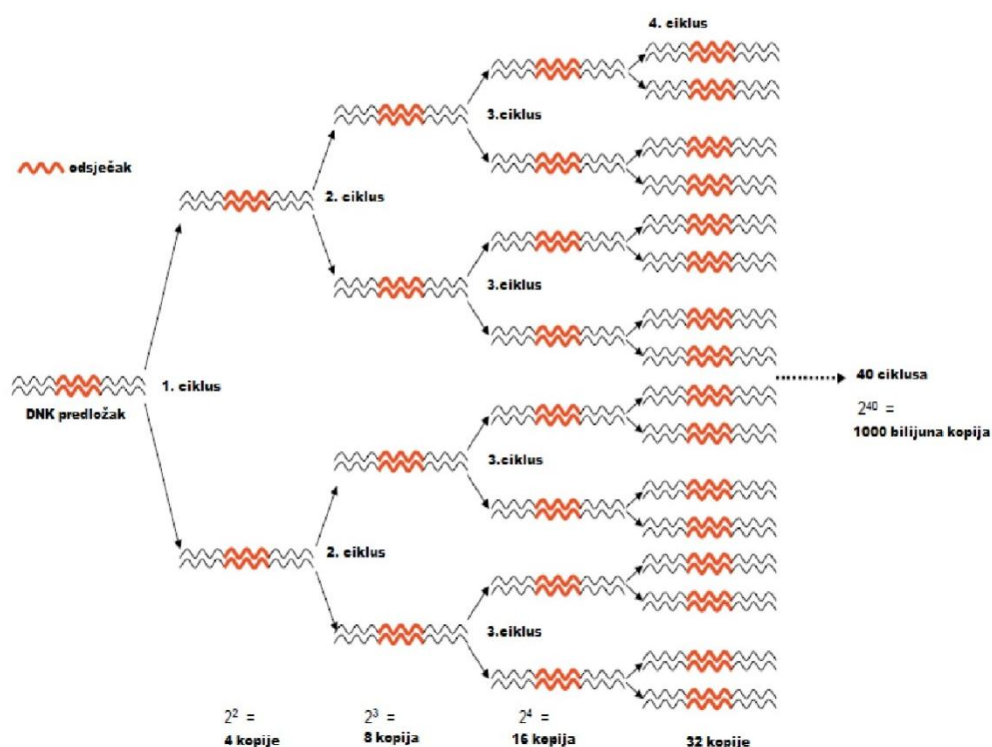
ELISPOT test zamišljen je tako, da se stimulacijom mitogenima ili specifičnim antigenom-, što je u ovom slučaju VNB, može dokazati izlučivanje ChIFN- γ .

ARIAANS i sur., (2008.) su proveli istraživanje kako bi odredili opseg odgovora T-limfocita u peradi. U istraživanju su koristili ELISPOT test te ICS kako bi se odredila količina proizvedenog ChIFN- γ kao novi alat za ispitivanje staničnog imunosnog odgovora u ptica. Prije ovog, takva istraživanja nisu provedena. 17 dana nakon posljednjeg cijepljenja kokoši su žrtvovane te je izdvojena slezena i izolirani su splenociti. Odrađen je ELISPOT čija je učinkovitost provjerena protočnom citometrijom. Dio splenocita bez stimulacije i bez dodavanja conA testiran je i ELISA kitom.

Dokaz citokina u stanicama:

Lančana reakcija polimerazom (PCR)

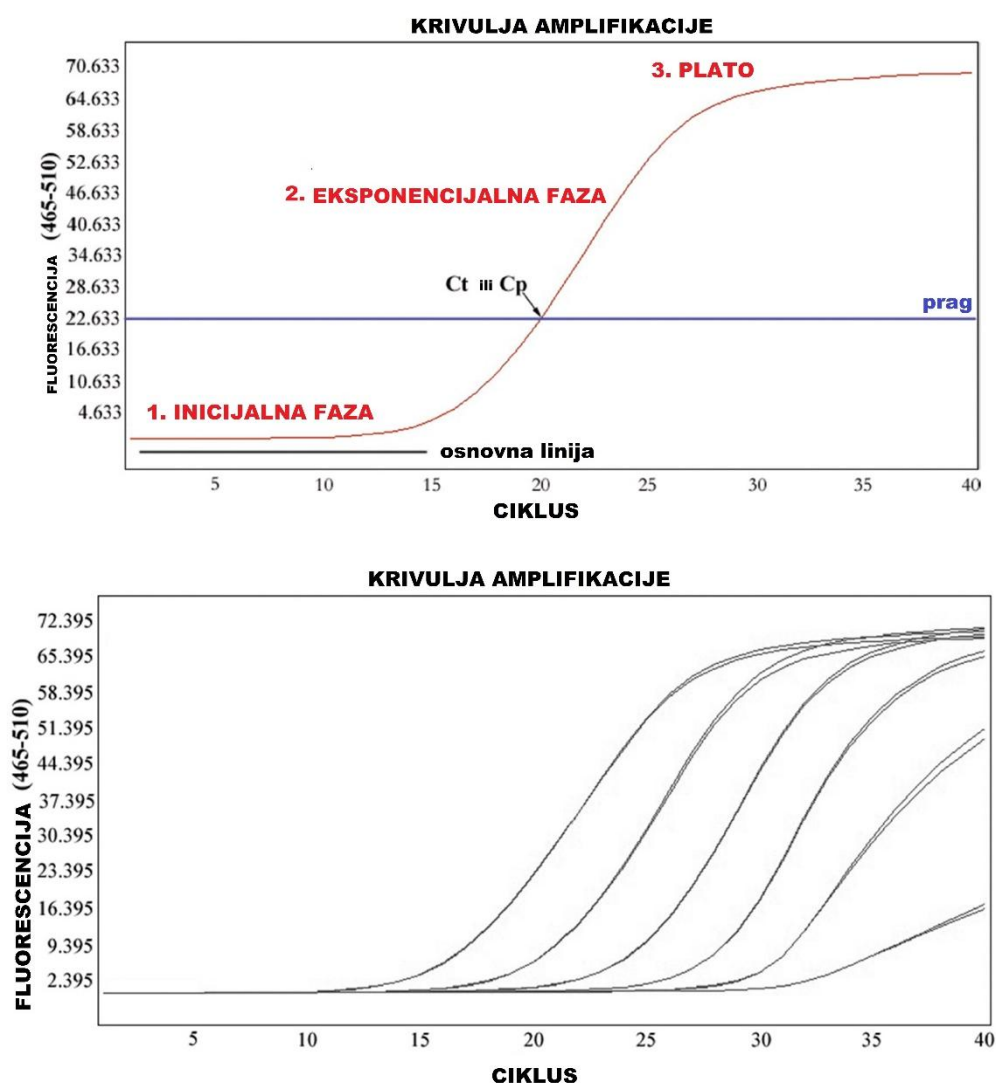
Lančana reakcija polimerazom (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) je vrlo jednostavna, osjetljiva, specifična i lako izvodljiva metoda. Sastoji se od eksponencijalnog umnažanja specifičnog odsječka DNK, a temelji se na principu replikacije DNK *in vivo* (Slika 8.). Dvostruka DNK se denaturira u dva jednostruka lanca DNK, umnaža se (2^n) i zatim se ovaj postupak ciklički ponavlja tijekom reakcije. Pri denaturaciji, temperatura se diže između 93-96°C, dvostruka DNK se otapa, a prekidanjem vodikovih vez se povećava broj nesparenih baza nukleotida te nastaju dvije jednostruke DNK, a prestaju sve enzimske reakcije. Nakon snižavanja temperature reakcije i specifičnog vezanja početnice, Taq polimeraza produžuje jednostruke DNK lance prema denaturiranom DNK predlošku i tako se ciklički udvostručuju lanci DNK odsječka (RODRIGUEZ-LAZARO i HERNANDEZ, 2013.).



Slika 8. Prikaz metode lančane reakcije polimerazom (PCR).

(Preuzeto i prilagođeno iz: RODRIGUEZ-LAZARO i HERNANDEZ, 2013.)

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (*engl.* Real Time PCR, qPCR), za razliku od klasičnog PCR-a, dozvoljava praćenje sinteze novih umnoženih fragmenata DNK molekula tijekom samog postupka PCR-a. Kontrola tijeka reakcije koristeći fluorescenciju daje nam trenutni uvid u cijeli proces, a ne samo na završetak reakcije te na taj način omogućava kvantifikaciju početnog RNK/DNK predloška (Slika 9.) (RODRIGUEZ-LAZARO i HERNANDEZ, 2013.).



Slika 9. Prikaz faza lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) (Preuzeto i prilagođeno iz: RODRIGUEZ-LAZARO i HERNANDEZ, 2013.)

Kako bi se procijenio stanični imunski odgovor kokoši na NB nakon cijepljenja, qPCR-om se mjeri ekspresija gena koji kodiraju citokine i kemokine. Stanični odgovor se

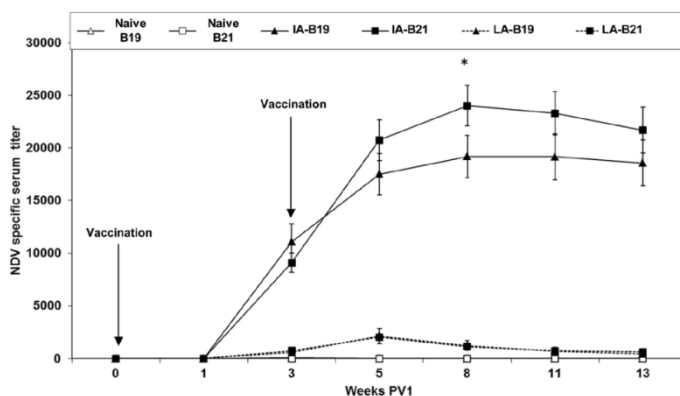
procjenjuje najčešće na temelju ekspresije IFN- γ iz splenocita (SHILPA i sur., 2014.). Ekspresija gena određuje se postupkom reverzne transkripcije (RT) i PCR-a od RNK izdvojene iz stanica. Za izolaciju RNK koristite se pročišćeni limfociti ili tkivo, a najčešće je to tkivo slezene. RNK treba biti izdvojena iz stimuliranog tkiva ili stanične linije. Daljnji postupak razlikuje se ovisno o proizvođaču kita (KAPCZYNSKI i sur., 2014.).

3. RASPRAVA

Svaka metoda koja se koristi u određivanju humoralne i stanične imunosti može biti vrlo korisna za daljnje razumijevanje imunosnog odgovora. Provedeno je mnogo istraživanja kako bi se odredio humoralni odgovor, a cilj ovog rada je bio opisati dostupne metode kojima je moguće odrediti trajanje stanične imunosti stimulacijom leukocita in vitro. Nakon cijepljenja uzorkovanjem, te izdvajanjem splenocita iz slezene žrtvovane životinje ili limfocita iz pune krvi, u različitim vremenskim razmacima tijekom istraživanja, opisanim metodama, uz prethodnu izolaciju, stimulaciju, i inkubaciju, moguće je na osnovu dobivenih rezultata, pratiti trajanje stanične imunosti.

IHA i ELISA su serološke probe koje se koriste pri ispitivanju učinkovitosti cijepljenja protiv NB i njime potaknute humoralne imunosti. Sam postupak je jednostavan jer ne zahtjeva dugotrajnu pripremu. Metoda izbora su u zemljama koje ne cijepu perad tijekom proizvodnje pa je u tim slučajevima dovoljan nalaz povišenog titra specifičnih protutijelaza dokaz NB. Obje metode mjere protutijela nastala u reakciji s antigenom. Nedostatak ELISA testa je taj da se test mora prilagoditi određenoj vrsti ptica za koju se koristi.

Na humoralni odgovor bitan utjecaj ima haplotip. Cijepljenje inaktiviranim cjepivom potaknulo je višu razinu zaštite tj. viši titar specifičnih serumskih protutijela u usporedbi s cijepljenjem živim cjepivom, što je dokazano ELISA-om (Slika 10.) (ANDERSEN i sur., 2017.). Sve cijepljene grupe su razvile specifični imunski odgovor na VNB za vrijeme istraživanja stimulacije IFN- γ . Kod grupe cijepljene sa živim atenuiranim cjepivom nakon specifične stimulacije VNB, učestalost proizvodnje IFN- γ je bila značajno viša nego u grupe cijepljene sa inaktiviranim cjepivom.



Slika 10. Specifični titar protutijela virusa newcastleske bolesti u dvije skupine kokoši sa različitim haplotipom, izmjeren ELISA-om (preuzeto iz: ANDERSEN i sur., 2017.)

Usporedno s tim, istraživanje KHALIFEH i sur., (2009.) je pokazalo da primjena antibiotika (tilmikoza, florfenikola, ili enrofloksacina) nakon cijepljenja inaktiviranim cjepivom za NB, uzrokuje pad razine protutijela u kokoši nesilica, ali pri tome titar ostaje na razini zaštite. Stoga se preporuča razborita upotreba antibiotskih pripravaka, za vrijeme i neposredno nakon cijepljenja, kako ne bi došlo do preklapanja učinaka cjepiva i antibiotika.

Za ispitivanje razine stanične imunosti koristi se nekoliko metoda od kojih svaka ima svoje prednosti i nedostatke. Staničnu imunost možemo određivati mjereći proliferaciju imunostnih stanica nakon stimulacije *in vitro*. Molekularne metode koje se pritom mogu koristiti su FCM, ELISA, ELISPOT i qPCR.

FCM se koristi se za mjerenje površinske ekspresije bilo kojeg staničnog biljega za koje je dostupno specifično monoklonsko protutijelo (DELUDE, 2005.). Monoklonska protutijela za sve pileće markere još uvijek nisu komercijalno dostupna, a s obzirom na visoku cijenu, uređaj je vrlo rijedak po laboratorijima.

ELISA testovi zahtijevaju nekoliko postupaka u samom izvođenju što može biti dugotrajno. Kitovi za izvođenje ELISA postupka su relativno skupi. Test je moguće primjeniti i u slučaju specifične i nespecifične stimulacije jer je specifičan za otpušteni antigen (citokin, IFN), a ne za stimulirajući agens (mitogen ili inaktivirani cjepni virus) (LAMBRECHT i sur., 2004.).

Kako bi se procijenila brzina razvoja staničnog odgovora dokazom IFN- γ nakon cijepljenja, dvije grupe kokoši je cijepljeno živim (okulonazalno) i inaktiviranim (intramuskularno) VNB, dok je treća grupa ostala necijepljena kontrola. Slijedom navedenih rezultata zaključuje se da su obje vrste cjepiva sposobne potaknuti proizvodnju značajnih količina ChIFN- γ nakon ponovne stimulacije, ali brži i snažniji imunostni odgovor zabilježen je u kokoši cijepljenih živim cjepivom (LAMBRECHT i sur., 2004.).

U istraživanju RAUW i sur. (2009.), jači stanični imunostni odgovor (izazvan u kombinaciji s adjuvansom hitozanom) može biti povezan s većim udjelom antigeno specifičnih T-limfocita u stanicama slezene, ili većom proizvodnjom ChIFN- γ .

ELISPOT test je vrlo sličan sandwich ELISA-i, kao i jednostavan za izvođenje. Međutim nije se često koristio u određivanju trajanja stanične imunosti u peradi, već se više počeo koristiti tek unazad nekoliko godina. Nedostatak metode je da ne daje kvalitativne informacije o vrsti stanica koje sudjeluju u imunološkom odgovoru, odnosno nema sposobnost

prepoznavanja individualnih T-limfocita koje luče citokine (ARIAANS i sur., 2008., ANONYM., 2014.).

ELISPOT testom i ICS bojanjem je u dvije grupe pilića praćena proliferacija T stanica kao odgovor na stimulaciju mitogenima (conA ili PMA i ionomicin), nakon cijepljena protiv NB. Nakon stimulacije splenocita podrijetlom od pilića cijepljenih s živim cjepivom VNB, izmjerio se značajan porast u broju stanica koje proizvode ChIFN- γ dok odgovor u kulturama splenocita necijepljenih pilića nije pronađen. Autor navodi kako u budućnosti, čim postanu dostupna sva protutijela, želi prilagoditi ELISPOT testove i za ostale citokine.

PCR metoda je postala često korištena tehnologija za mjerenje izlučivanja ptićjih citokina (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.). Zbog zahtjevnosti izvođenja dugotrajan je postupak s obzirom da se stanice trebaju najprije izolirati, stimulirati, inkubirati i izdvojiti RNK pa tek nakon podešavanja koncentracija i primjene početnica uzorak može na ispitivanje.

Prednost qPCR-a je, osobito ako se RT i PCR izvode u jednom koraku, smanjena mogućnost kontaminacije uzoraka, sam postupak je jednostavan i brzo se izvodi, te ima visok raspon kvantifikacije. Visoko je osjetljiva metoda za kvantificiranje širokog spektra citokina i kemokina (KAPCZYNSKI i KOGUT, 2008.). Njena pouzdanost je visoka, te se koristi za kvantifikaciju DNK odsječaka od interesa (RODRIGUEZ-LAZARO i HERNANDEZ, 2013.). Primjenom qPCR-a u kombinacij s ELISA i ELISPOT metodom dobili bi uvid u stvarnu proizvodnju stimuliranog proteina.

Smatra se da je stanični imunosni odgovor vrlo bitan za ranu i cijepljenjem potaknutu zaštitu organizma, međutim sam nije dovoljan da zaštiti ptice od VNB-a.

4. ZAKLJUČCI

Slijedom opisanih rezultata istraživanja valja zaključiti:

1. Stanični imunosni odgovor je veoma bitan za ranu i cijepljenjem potaknutu zaštitu organizma, međutim sam nije dovoljan da zaštiti ptice od VNB.
2. ChIFN- γ ima važnu ulogu u staničnoj imunosti i dobar je pokazatelj aktivnosti stanične imunosti.
3. ELISA-om i ELISPOT-om se nakon stimulacije mitogenima ili antigenskim-specifičnim podražajem, (što je u ovom slučaju VNB), može dokazati izlučivanje ChIFN- γ , odnosno promatra se proliferacija T stanica kao odgovor na stimulaciju nakon cijepljenja.
4. Metoda poput qPCR-a omogućuje jednostavan i učinkovit posredan uvid u ekspresiju citokina nakon stimulacije *in vitro*.
5. Istraživanja o trajanju specifičnog staničnog imunosnog odgovora na VNB ne ukazuju na stvarno stanje *in vivo* te je potrebno provesti daljnja istraživanja.

5. LITERATURA

1. AL-GARIB S. O., A. L. J. GIELKENS, E. GRUYS, G. KOCH (2003): Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *Worlds. Poult. Sci. J.* 59, 185–200.
2. AMARASINGHE, G. K. K., Y. BÀO, C. F. BASLER, S. BAVARI, M. BEER, N. BEJERMAN, K. R. BLASDELL, A. BOCHNOWSKI, T. BRIESE, A. BUKREYEV, C. H. CALISHER, K. CHANDRAN, P. L. COLLINS, R. G. DIETZGEN, O. DOLNIK, R. DÜRRWALD, J. M. DYE, A. J. EASTON, H. EBIHARA, Q. FANG, P. FORMENTY, R. A. M. FOUCHIER, E. GHEDIN, R. M. HARDING, R. HEWSON, C. M. HIGGINS, J. HONG, M. HORIE, A. P. JAMES, D. JIĀNG, G. P. KOBINGER, H. KONDO, G. KURATH, R. A. LAMB, B. LEE, E. M. LEROY, M. LI, A. MAISNER, E. MÜHLBERGER, S. V. NETESOV, N. NOWOTNY, J. L. PATTERSON, S. L. PAYNE, J. T. PAWESKA, M. N. PEARSON, R. E. RANDALL, P. A. REVILL, B. K. RIMA, P. ROTA, D. RUBBENSTROTH, M. SCHWEMMLE, S. J. SMITHER, Q. SONG, D. M. STONE, A. TAKADA, C. TERREGINO, R. B. TESH, K. TOMONAGA, N. TORDO, J. S. TOWNER, N. VASILAKIS, V. E. VOLCHKOV, V. WAHL-JENSEN, P. J. WALKER, B. WANG, D. WANG, F. WANG, L. F. WANG, J. H. WERREN, A. E. WHITFIELD, Z. YAN, G. YE, J. H. KUHN (2017): Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Arch. Virol.* 162, 2493–2504.
3. ALEXANDER, D. J., D. A. SENNE (2008): Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. *In: Diseases of Poultry.* (Saif, Y. M., Editor-in-chief). 12th ed., Blackwell, Ames, pp. 75–100.
4. ANDERSEN S. H., L. VERVELDE, K. SUTTON, L. R. NORUP, E. WATTRANG, H. R. JUUL-MADSEN, T. S. DALGAARD (2017): Quantification and phenotypic characterisation of peripheral IFN- γ producing leucocytes in chickens vaccinated against Newcastle disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 193–194, 18–28.
5. ANONYMUS (2012): Newcastle disease. Chapter 2.3.14. *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* Office International des Epizooties (OIE), Paris, pp. 576–589. (last accessed on 28th January 2018: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf).

6. ANONYMOUS (2013): Pravilnik o mjerama kontrole Newcastleske bolesti. Narodne novine br. 45/2013.
7. ANONYMOUS (2014): BD™ ELISPOT. ELISPOT KIT Instruction Manual. Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Jose, CA, SAD.
8. ANONYMOUS (2016): Uputa o provođenju kontrole imunosti peradi na Newcastlesku bolest. Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb, Hrvatska.
9. ANONYMOUS (2017): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2017. godini. Narodne novine br. 5/2017.
10. ARIAANS, M. P., P. M. van de HAAR, J. W. LOWENTHAL, W. van EDEN, E. J. HENSEN, L. VERVELDE (2008): ELISPOT and intracellular cytokine staining: novel assays for quantifying T cell responses in the chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1398–1404.
11. BALENOVIĆ, M., V. SAVIĆ, A. EKERT KABALIN, L. JURINOVIĆ (2009): Izračun relativne količine gRNK za kokošji IFN- γ nakon stimulacije virusom Newcastleske bolesti soj La Sota. *STOČARSTVO* 63, 93–102.
12. BIĐIN, Z. (2008): Newcastleska bolest. *In: Bolesti peradi. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb*, pp. 45-54.
13. DAI H., Z. XU, M. WANG, J. CHEN, X. CHEN, Z. PAN, X. JIAO (2016): Development of a double-monoclonal antibody sandwich ELISA: Tool for chicken interferon- γ detection *ex vivo*. *Can J Vet Res.* 80, 134-40.
14. DALGAARD T. S., L. R. NORUP, A. R. PEDERSEN, K. J. HANDBERG, P. H. JØRGENSEN, H. R. JUUL-MADSEN (2010): Flow cytometric assesment of chicken T cell-mediated immune responses after Newcastle disease virus vaccination and challenge. *Vaccine* 28, 4506–4514.
15. DAY, M., J., R. D. SCHULTZ (2013): Veterinarska imunologija, Načela i primjena, Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatska.
16. DELUDE, R. L. (2005): Flow cytometry. *Crit. Care Med.* 33, 426-427.
17. FAIRBROTHER, A., J. SMITS, K. A. GRASMAN (2004): Avian immunotoxicology. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 105-132.
18. GALLILI, G. E., D. BEN-NATHAN (1998): Newcastle disease vaccines. *Biotechnol. Adv.* 16, 343-366.
19. GOTTSTEIN, Ž. D. HORVATEK TOMIĆ, M. LUKAČ, G. NEDELJKOVIĆ, E. Z. GALINDO MEDINA, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, M. VLAHEK, Z. BANOVEC, L.

- VINDIŠ (2017): Serological monitoring of viral diseases in broiler parent flocks in Croatia. (Serološki monitoring virusnih bolesti u roditeljskih jata teških linija kokoši u Hrvatskoj). Poultry Days 2017 Proceedings. 15th-17 th May 2017, Šibenik, Croatia, pp. 57-60.
20. KALETA, E., C. BALDAUF (1998): Newcastle disease in free-living and pet birds. *In: Newcastle disease. (Alexander, D. J., Ed.). Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 197-246.*
 21. KAPCZYNSKI D. R. (2008): Evaluating the Cell-Mediated Immune Response of Avian Species to Avian Influenza Viruses. *In: Avian Influenza Virus. (Spackman E., ed.) Humana Press, New York. Methods in Molecular Biology 436, 113-126.*
 22. KAPCZYNSKI D.R., M. H. KOGUT (2008): Measurement of Avian Cytokines with Real-Time RT-PCR Following Infection with the Avian Influenza Virus Viruses. *In: Avian Influenza Virus. (Spackman, E., ed.). Humana Press, New York, NY. Methods in Molecular Biology 436, 127-134.*
 23. KAPCZYNSKI, D. R., C. L. AFONSO, P. J. MILLER (2013): Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 447– 453.
 24. KAPCZYNSKI D. R., H. J. JIANG, M. H. KOGUT (2014): Characterization of Cytokine Expression Induced by Avian Influenza Virus Infection with Real-Time RT-PCR. *In: Avian Influenza Virus. (Spackman, E., ed.). Humana Press, New York, NY. Methods in Molecular Biology 1161. pp. 217-233.*
 25. KHALIFEH M. S., M. M. AMAWI, E. A. ABU-BASHA, I. BANI YONIS (2009): Assessment of humoral and cellular-mediated immune response in chickens treated with tilmicosin, florfenicol, or enrofloxacin at the time of Newcastle disease vaccination. *Poult Sci.* 88, 218-224.
 26. LAMBRECHT, B., M. GONZE, G. MEULEMANS, T .P. VAN DEN BERG (2004): Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon-gamma in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathol.* 33, 343-350.
 27. MILLER P. J., G. KOCH (2013): Newcastle Disease. *In Diseases of poultry. (Swayne, D. E., editor-in-chief; J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, V. L. Nair, Eds.). 13th ed., Blackwell Publishing Ltd., Ames, pp. 89–130.*
 28. NORUP, L. R., T.S. DALGAARD, A R. PEDERSEN, H. R. JUUL-MADSEN (2011): Assessment of Newcastle disease-specific T cell proliferation in different inbred MHC chicken lines. *Scand. J. Immunol.* 74, 23–30.

29. RAUW, F., Y. GARDIN, V. PALYA, S. VAN BORM, M. GONZE, S. LEMAIRE, T. VAN DEN BERG, B. LAMBRECHT (2009): Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. *Vaccine* 27, 3631–3642.
30. RODRIGUEZ-LAZARO, D., M. HERNANDEZ (2013): Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Curr. Issues Mol. Biol.* 15, 25–38.
31. SHILPA, P., J. J. KIRUBAHARAN, N. D. J. CHANDRAN, N. GNANAPRIYA (2014): Assessment of cellular and mucosal immune responses in chicks to Newcastle disease oral pellet vaccine (D58 strain) using qPCR. *Virus Dis* 25, 467–473.
32. SUSTA, L., P. J. MILLER, C. L. AFONSO, C. C. BROWN (2010): Clinicopathological characterization in poultry of three strains of newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Vet. Pathol.* 48, 349-360.

6. SAŽETAK

TRAJANJE STANIČNE IMUNOSTI U KOKOŠI LAKE PASMINE ZA VIRUS NEWCASTLESKE BOLESTI ODREĐENE STIMULACIJOM LEUKOCITA *IN* *VITRO*

Newcastleska bolest (NB) je izuzetno kontagiozna virusna zarazna bolest kokoši i drugih vrsta ptica. Kontrola bolesti se provodi cijepljenjem i nespecifičnim mjerama.

Kako bi se izmjerila učinkovitost postojećeg cjepnog programa na proizvodnoj farmi može se paralelno koristiti procjena humoralne i stanične imunosti.

Cilj ovog rada je opisati metode kojima se može odrediti stanična imunost u određenim vremenskim razmacima od cijepljenja i time njeno trajanje.

Stanična imunost određuje se mjerenjem *in vitro* proliferacije imunosnih stanica nakon stimulacije uz određivanje razine citokinskog odgovora. Od metoda mogu se koristiti protočna citometrija, imunoenzimni test, ELISPOT test, a od molekularnih metoda lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.

U rutinskoj dijagnostici kao najprikladnija metoda pokazao se PCR zbog jednostavnosti i brzine izvedbe. Stanični imunosni odgovor je veoma bitan za ranu i cijepljenjem potaknutu zaštitu organizma, međutim sam nije dostatan da zaštiti ptice od VNB. Dostupna istraživanja ne ukazuju na stvarno stanje *in vivo* te je potrebno provesti dodatna istraživanja.

Ključne riječi: newcastleska bolest, stanična imunost, stimulacija leukocita

7. SUMMARY

DURATION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY FOR NEWCASTLE DISEASE IN LAYING HENS DETERMINED BY *in vitro* stimulation OF LEUKOCYTES

Newcastle disease (ND) is very contagious viral disease of poultry and other birds. Control of ND is achieved by vaccination and non-specific measures. The efficiency of vaccination programs implemented on farms is assessed by testing humoral and cell-mediated immunity (CMI).

The aim of this paper was to describe the methods used for determination of CMI in certain time points after vaccination (dpv), and thus, duration of CMI. Cell-mediated immunity can be determined by *in vitro* stimulation and proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and the level of cytokine response/release. Flow cytometry, ELISA, ELISPOT, and Real -Time PCR are mostly used in CMI assessment. Real-Time PCR has been proven to be the most appropriate method for routine diagnostic, due to simplicity and speed of the procedure.

CMI plays a crucial role in early immune response following immunisation. However, it's not sufficient to protect by itself the birds from NDV infection. Available studies so far don't reveal the true *in vivo* status, therefore further research is required.

Keywords:newcastle disease, cell-mediated immunity, stimulation of leukocytes

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9.11.1989. godine u Čakovcu. Pohađala sam I. Osnovnu školu u Čakovcu te Gimnaziju Josipa Slavenskog u Čakovcu, jezični smjer. Tijekom srednje škole pohađala sam uz redovnu nastavu i školu stranih jezika, gdje sam još dodatno učila engleski i francuski jezik. 2007. godine uspješno sam položila FCE (First Certificate English) ispit iz engleskog jezika, Sveučilišta Cambridge. Također sam bila članica Dramske skupine mladih u Čakovcu te sam tijekom svog osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja pjevala u školskom zboru. Tijekom školovanja na Veterinarskom fakultetu bila sam aktivna članica Udruge studenata veterinarske medicine „Equus“.